

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年5月10日 (10.05.2002)

PCT

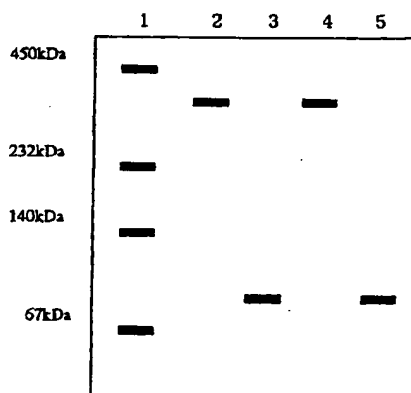
(10) 国際公開番号
WO 02/36779 A1

- (51) 国際特許分類: CI2N 15/53, (74) 代理人: 小林孝次(KOBAYASHI, Takashi); 〒171-0022 東京都豊島区南池袋2-47-6 パレス南池袋701号 Tokyo (JP).
9/04, 1/21, 1/20, C12Q 1/32
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/09556
- (22) 国際出願日: 2001年10月31日 (31.10.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2000-332085 2000年10月31日 (31.10.2000) JP
特願 2000-357102 2000年11月24日 (24.11.2000) JP
特願2001-276832 2001年9月12日 (12.09.2001) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 早出広司 (SODE, Koji) [JP/JP]; 〒152-0013 東京都目黒区南1-13-16 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL GLUCOSE DEHYDROGENASE AND PROCESS FOR PRODUCING THE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: 新規グルコース脱水素酵素及び該脱水素酵素の製造方法



(57) Abstract: A novel glucose dchydrogenasc, which is an enzyme having a high substrate specificity, being economically produced, being free from any effect of dissolved oxygen in a sample and having a particularly high heat stability, can be obtained by culturing a microorganism belonging to the genus *Burkholderia* and being capable of producing glucose dehydrogenase and then collecting the glucose dehydrogenase from the culture medium and/or the microbial cells.

(57) 要約:

ブルクホルデリア属に属し、グルコース脱水素酵素を産生する能力を有する微生物を培地に培養し、同培地又は／及び前記微生物菌体からグルコース脱水素酵素を採取することにより、基質特異性が高く、安価に生産でき、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けない酵素であって、特に熱安定性に優れた新規なグルコース脱水素酵素を得る。

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/36779 A1



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規グルコース脱水素酵素及び該脱水素酵素の製造方法

技術分野

本発明は、新規なグルコース脱水素酵素及びその製造方法、同酵素をコードするDNA、同酵素をコードするDNAを含有する組換えベクター、同組換えベクターで形質転換された形質転換体、同酵素を生産する新規な微生物、前記酵素、形質転換体又は微生物を含む酵素電極を用いたグルコースセンサ、及びグルコースアッセキットに関する。

背景技術

特定の基質に対して特異的に反応する酵素を用いたバイオセンサの開発は、産業の分野を問わず盛んに行われている。その中でも特にバイオセンサの1つであるグルコースセンサは、主に医療分野で測定方法やその方法を利用した装置の開発が盛んに行われている。

グルコースセンサは、1962年にClarkとLyonsによってグルコースオキシダーゼと酸素電極を組み合わせたバイオセンサーの報告 (L.c.Clark, J. and Lyons, C. "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." Ann, n. y. Acad. Sci. 105:20-45) が最初にされて以来、約40年ほどの歴史を有している。

このように、グルコースセンサに、酵素としてグルコースオキシダーゼを採用してからの歴史は、長い。なぜならグルコースオキシダーゼは、グルコースに対する基質特異性が高く、熱安定性に優れており、更に酵素の量産化が可能であり、生産コストが他の酵素と比べて安価である、からである。

基質特異性が高いということは、酵素がグルコース以外の糖とは反応しないため、測定値に誤差を生じることなく、正確な測定が行なえるという利点に通じる。

また、熱安定性に優れているということは、酵素が熱により変性し酵素活性が失活するという問題を防止することができ、長期間正確な測定が行えるという利

点に通じる。

しかし、グルコースオキシダーゼは、基質特異性が高く、熱安定性に優れ、安価に生産できる一方、以下で説明するような溶存酸素の影響を受け、測定結果に影響があるという問題を有する。

一方、グルコースオキシダーゼ以外に、グルコース脱水素酵素（以下、「グルコースデヒドロゲナーゼ」ともいう）を利用したグルコースセンサの開発も行われてきた。そして、酵素も、微生物から発見されている。

例えば、バチルス（*Bacillus*）属由来のグルコースデヒドロゲナーゼ（EC1.1.1.47）及びクリプトコッカス（*Cryptococcus*）属由来グルコースデヒドロゲナーゼ（EC1.1.1.119）が知られている。

前者のグルコースデヒドロゲナーゼ（EC1.1.1.47）は、 β -D-グルコース + $\text{NAD(P)}^+ \rightarrow \text{D-}\delta$ -グルコノラクトン + $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ の反応を触媒する酵素であり、後者のグルコースデヒドロゲナーゼ（EC1.1.1.119）は、 $\text{D-グルコース} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{D-}\delta$ -グルコノラクトン + $\text{NADPH} + \text{H}^+$ の反応を触媒する酵素であり、前述した微生物由来のグルコースデヒドロゲナーゼは、既に市販もされている。

これらグルコースデヒドロゲナーゼは、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けないという利点を有する。このことは、酸素分圧が低い環境下で測定を行ったり、酸素量が多く要求される高濃度サンプルを測定する場合であっても、測定結果に誤差を及ぼさずに正確に測定することができるという利点に通じる。

しかし、グルコースデヒドロゲナーゼは、溶存酸素の影響を受けない一方、熱安定性が悪く、基質特異性がグルコースオキシダーゼよりも劣るという問題点を有する。

そこで、グルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼの両欠点を補う酵素の提供が望まれていた。

尚、本発明者は Sode, K., Tsugawa, W., Yamazaki, T., Watanabe, M., Ogasawara, N., and Tanaka, M., (1996) *Enzyme Microb. Technol.* 19, 82-85. や、Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K., (1999) *Appl. Biochem. and Biotech.* 77-79/0325 や、Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K., (1999) *Biotech. Lett.* 21, 199-202 において、温泉近くの土壌より採取した試料を用い、グルコース脱水素酵素についての研究結果

を報告している。

しかし、該酸素を産生する能力を有する菌株の同定は該研究段階では行われていなかった。

発明の開示

本発明は、従来から知られているグルコースオキシダーゼやグルコースデヒドロゲナーゼ両者の欠点をそれぞれ補う性質を持ち、基質特異性が高く、熱安定性に優れ、安価に生産でき、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けない酵素を提供することを課題とする。

また本発明は、前記酵素の製造方法、該酵素の特性を活かしたタンパク質および該酵素を生産する新規な微生物を提供することを課題とする。

また本発明は、前記酵素をコードするDNA、同酵素をコードするDNAを含有する組換えベクター、同組換えベクターで形質転換された形質転換体を提供することを課題とする。

また本発明は、前記酵素、形質転換体又は前記微生物を含む酵素電極を用いたグルコースセンサ、及び前記酵素を含むグルコースアッセキットを提供することを課題とする。

本発明者は、温泉近くの土壌より上記の目的に合った酵素を生産するブルクホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*) を単離することに成功し、本発明に至った。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) ブルクホルデリア属に属し、グルコース脱水素酵素を産生する能力を有する微生物を培地に培養し、同培地又は／及び前記微生物菌体からグルコース脱水素酵素を採取することを特徴とするグルコース脱水素酵素の製造方法。

(2) 前記微生物がブルクホルデリア・セパシアである(1)のグルコース脱水素酵素の製造方法。

(3) 前記グルコース脱水素酵素が下記性質を有することを特徴とする(1)又は(2)のグルコース脱水素酵素の製造方法。

①作用：

グルコースの脱水素反応を触媒する。

②還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60 kDaと分子量約43 kDaを示すサブユニットからなる。

③TSK gel G3000SW（東ソー（株）製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約380 kDaを示す。

④至適反応温度：

45℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

（4）前記分子量約43 kDaのサブユニットが電子伝達タンパク質であることを特徴とする（3）のグルコース脱水素酵素の製造方法。

（5）前記電子伝達タンパク質がチトクロムCであることを特徴とする（4）のグルコース脱水素酵素の製造方法。

（6）ブルクホルデリア属に属する微生物によって産生され得るグルコース脱水素酵素。

（7）前記微生物がブルクホルデリア・セバシアである（6）のグルコース脱水素酵素。

（8）前記グルコース脱水素酵素が下記性質を有することを特徴とする（6）又は（7）のグルコース脱水素酵素。

①作用：

グルコースの脱水素反応を触媒する。

②還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60 kDaと分子量約43 kDaを示すサブユニットからなる。

③TSK gel G3000SW（東ソー（株）製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約380 kDaを示す。

④至適反応温度：

45℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

（9）前記分子量約43 kDaのサブユニットが電子伝達タンパク質であることを特徴とする（8）のグルコース脱水素酵素。

（10）前記電子伝達タンパク質がチトクロムCであることを特徴とする（9）のグルコース脱水素酵素。

(11) 前記分子量約 60 kDa のサブユニットが、配列番号 3 のアミノ酸番号 2 ～ 12 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする (8) ～ (10) のいずれかのグルコース脱水素酵素。

(12) 前記 43 kDa のサブユニットの N 末端が配列番号 5 のアミノ酸配列を有する請求項 8 ～ 11 のいずれか 1 項に記載のグルコース脱水素酵素。

(13) 前記分子量約 60 kDa のサブユニットが以下の (A) または (B) に示すタンパク質である (11) のグルコース脱水素酵素。

(A) 配列番号 3 のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 3 のアミノ酸配列において、1 又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

(14) 45℃付近と 75℃付近にそれぞれ活性ピークを有することを特徴とする (6) のグルコース脱水素酵素。

(15) (10) のグルコース脱水素酵素のサブユニットであって、配列番号 5 のアミノ酸配列を有することを特徴とするチトクローム C。

(16) (15) のチトクローム C の一部をコードし、配列番号 8 に記載の塩基配列を有する DNA。

(17) (15) のチトクローム C の一部をコードし、配列番号 1 に記載の塩基配列のうち塩基番号 2386 ～ 2467 の塩基配列を有する DNA。

(18) (15) のチトクローム C のシグナルペプチドをコードし、配列番号 1 の塩基配列のうち塩基番号 2386 ～ 2451 の塩基配列を含む DNA。

(19) チトクローム C のシグナルペプチドであって、配列番号 4 のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号 1 ～ 22 のアミノ酸配列を有するペプチド。

(20) 下記性質を有するタンパク質。

① サブユニットとして (6) のグルコース脱水素酵素を構成し得る。

② グルコース脱水素酵素活性を有する。

③ 還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約 60 kDa を示す。

④ 至適反応温度：

75℃付近 (Tris-HCl緩衝液、pH8.0)。

(21) 配列番号3においてアミノ酸番号2～12のアミノ酸配列を含むことを特徴とする(20)のタンパク質。

(22) 前記タンパク質が以下の(A)または(B)に示すタンパク質である(21)のグルコース脱水素酵素。

(A) 配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

(23) 以下の(A)または(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

(24) 以下の(A)または(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

(25) 以下の(a)または(b)に示すDNAである(24)のDNA。

(a) 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる塩基配列又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(26) (24)又は(25)のDNAを含有する組換えベクター。

(27) (18)のシグナルペプチド及びβ-サブユニットをコードする塩基配列を含む(26)の組換えベクター。

(28) (24)又は(25)のDNA、又は(26)又は(27)の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

(29) (28)の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素の製造方法。

(30) ブルクホルデリア・セバシアKS1株(FERM BP-7306)。

(31) (6)～(14)のいずれかのグルコース脱水素酵素、(20)～(23)のいずれかのタンパク質、(27)の形質転換体、又は(30)の菌株を含む酵素電極を用いたグルコースセンサ。

(32) (6)～(14)のいずれかのグルコース脱水素酵素、又は(20)～(23)のいずれかのタンパク質を含むグルコースアッセイキット。

(33) 配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(34) 配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

(35) 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～761からなる塩基配列を含む(34)のDNA。

(36) (34)又は(35)のDNAと、(24)又は(25)のDNAをこの順に含むDNA。

(37) 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～2380からなる塩基配列を含む(36)のDNA。

(38) (36)又は(37)のDNAを含有する組換えベクター。

(39) (18)のシグナルペプチド及び β -サブユニットをコードする塩基配列を含む(38)の組換えベクター。

(40) (36)又は(37)のDNA又は(38)又は(39)の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

(41) (40)の形質転換体を培養して、(36)又は(37)のDNAの発現物質としてグルコース脱水素酵素を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素の製造方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

<1>本発明のグルコース脱水素酵素を産生する新規菌株

本発明酵素（以下、「本酵素」または「GDH」ということがある）は、ブルクホルデリア属に属する細菌によって生産され得る。本発明に用いるブルクホルデリア属細菌は、本酵素の生産能を有するブルクホルデリア属細菌であれば特に制限されないが、ブルクホルデリア・セバシア、特にブルクホルデリア・セバシアKS1株が好ましい。この菌株は、後記実施例に示すように、本発明者らが温泉付近の土壌から分離した新規菌株であり、その菌学的性質からブルクホルデリア・セバシアと同定された。従来、ブルクホルデリア属に属する微生物がグルコース脱水素酵素を産生しうることは知られていない。この菌株は、KS1株と命名された。この株は、平成12年9月25日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に微生物受託番号第FERM BP-7306として寄託されている。

なお、本発明者らはブルクホルデリア・セバシア KS1株以外の株について、財団法人発酵研究所（Institute for Fermentation, Osaka, IFO）又は理化学研究所微生物系統保存施設（Japan Collection of Microorganisms, JCM）に寄託されている同ブルクホルデリア・セバシアのいくつかの菌株を取り寄せてグルコース脱水素酵素活性を測定したところ、いずれの菌株にも活性があることを確認した。

<2>本発明のグルコース脱水素酵素

本発明のグルコース脱水素酵素は、グルコース脱水素酵素生産能を有するブルクホルデリア属細菌、例えばブルクホルデリア・セバシアKS1株を、通常、微生物の培養に用いられる栄養培地、好ましくは酵素生産能を高めるためにグルコース或はグルコースを含む物質を添加した培地で培養することにより、培養生成物中又は菌体中に生産蓄積されるので、公知の方法で採取することができる。更に本酵素の製造方法を、ブルクホルデリア・セバシアKS1株を例として具体的に説明する。まずブルクホルデリア・セバシアKS1株を適当な栄養培地、例えば適当な炭素源、窒素源、無機塩類、グルコース或はこれらを含む物質などを含む培地で培養して本酵素を培養生成物中か菌体中に生産蓄積させる。

炭素源としては、資化できるものはいずれの物質も利用でき、例えば、D-グルコース、L-アラビソース、D-キシロース、D-マンノース、デンプン、各

種ペプトン類などが挙げられる。窒素源としては、酵母エキス、麦芽エキス、各種ペプトン類、各種肉エキス類、コーンステープリカー、アミノ酸溶液、アンモニウム塩など有機、無機の窒素化合物又はこれらを含む物質が利用できる。無機塩としては、各種リン酸塩、マグネシウム、カリウム、ナトリウム、カルシウムなどの塩類が使用される。また必要に応じて菌の生育或は酵素生産に必要な各種の無機物や有機物、例えばシリコン油、ゴマ油、各種界面活性剤などの消泡剤やビタミン類を培地に添加することができる。

培養の形態は、液体培養でも固体培養でもよいが、通常は液体培養が好適である。

こうして得られた培養物の培地中又は／及び菌体中から本発明酵素を得ることが出来る。菌体中にある酵素は、菌体を破砕あるいは溶解することによって、菌体抽出液として得られる。

培養生成物中あるいは菌体抽出液中のグルコース脱水素酵素は、イオン交換体、ゲル濾過担体、ハイドロフォービック（疎水性）担体などを用いたクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製することができる。

本酵素の活性は、公知のグルコース脱水素酵素の活性測定と同様の方法で測定することができる。具体的には、例えば後記実施例に示す方法によって測定できる。

次に本発明の新規グルコース脱水素酵素の理化学的性質を示す。

①作用：

グルコースの脱水素反応を触媒する。

②還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaと分子量約43kDaを示すサブユニットからなる。

③TSK gel G3000SW（東ソー（株）製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約380kDaを示す。

④至適反応温度：

45℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

尚、上記グルコース脱水素酵素は、上記条件で45℃付近に活性ピークを有するが、75℃付近にも活性ピークを有する（図3（a）参照）。このように、

2つの温度領域で活性ピークを示すGDHは知られていない。

尚、分子量及び至適温度は後記実施例に記載の方法で測定できる。

上記、本発明のグルコース脱水素酵素は分子量約60 kDaの α サブユニットと分子量約43 kDaの β サブユニットの2つの別個のポリペプチドで構成されている（以下、このグルコース脱水素酵素を「多量体酵素」ということがある）が、本発明者らはさらに2つのサブユニットにつき詳細に検討した。

β サブユニットはチトクロムCであることがわかった（後記実施例で示す）。 α サブユニットのみを含むタンパク質は以下の理化学的性質を示す。

- ①サブユニットとして前記多量体酵素を構成し得る。
- ②グルコース脱水素酵素活性を有する。
- ③還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量60 kDaを示す。
- ④至適反応温度：

75℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

尚、至適温度は後記実施例に記載の方法で測定できる。

尚、このタンパク質はそれ自身酵素活性を有しているため、説明の内容に応じ、適宜このタンパク質をペプチド酵素もしくは酵素と言い換えて使用することとする。

本発明のペプチド酵素の具体的態様として、配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。また同ペプチド酵素は、GDH活性を有する限り、配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。尚、配列番号3には、配列番号1の塩基配列によってコードされ得るアミノ酸配列を示してあるが、N末端のメチオニン残基は、翻訳後に脱落している可能性がある。

また、本発明の多量体酵素の具体的態様として、 α サブユニットが配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質を含む多量体が挙げられる。また同多量体酵素は、GDH活性を有する限り、 α サブユニットが配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質を含む多量体であってもよい。

本発明において「1又は複数」とは、1～10個、好ましくは1～5個、特に好ましくは1～3個である。

本発明者らは前記 α サブユニット又は前記 β サブユニット以外にも、 γ サブユニットの存在を確認している。

後述する実施例においては、前記 γ サブユニットは、培養上清あるいは菌体抽出液中から本発明の酵素を精製する段階で除去されて、精製後の酵素では γ サブユニットが確認されなかった。しかし、実施例に示したように、 α サブユニットとともに γ サブユニットを発現させると、 α サブユニットのみを発現させた場合に比べて高い酵素活性が得られた。このことから、 γ サブユニットは、微生物体内において α サブユニットが生成する際に何らかの関わりがあるタンパク質であることが示唆された。いずれの場合も α サブユニットの比活性（タンパク質当たりの酵素活性）が同じであるとすれば、酵素活性は酵素量を反映するから、酵素活性が低いことは酵素としての α サブユニットの量が少ないことを示している。一方、生成した α サブユニットが γ サブユニットによって何らかの保護を受けているのか、それともタンパク質としての α サブユニットの充分発現しているが、 γ サブユニットが存在しないため酵素活性を示すことができる立体構造を取れずに、結果的に酵素活性が低くなったのかもしれない。いずれにしても、 γ サブユニットを α サブユニットとともに発現させることにより、高い酵素活性が得られる。

<3>本発明のDNA

本発明のDNAは、本発明のDNAを含有する微生物、例えばブルクホルデリア・セパシアから取得することができる。本発明のDNAは、本発明を完成する過程においては、ブルクホルデリア・セパシア染色体DNAから単離されたが、本発明によりその塩基配列及び同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列が明らかとなったので、これらの配列に基づいて化学合成することによっても取得することができる。また、前記配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブ又はプライマーとするハイブリダイゼーション又はPCRによって、ブルクホルデリア・セパシア等の染色体DNAから取得することもできる。

本発明のDNAは、配列番号3に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするものの他、配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、GDH活性を有するタンパク質をコードするものであってもよい。

本発明のDNAは具体的には、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる塩基配列を含むDNAが挙げられる。配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる塩基配列は、配列番号3のアミノ酸配列を有するGDHの α サブユニットをコードしている。

また本発明のDNAは、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる塩基配列又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、GDH活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

尚、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～761からなる塩基配列は、 γ サブユニットをコードしていると推定される。そのアミノ酸配列を配列番号2に示す。 α サブユニットの上流域に γ サブユニットの構造遺伝子が含まれることにより、微生物によって α サブユニットを生産する際に、先ず γ サブユニットが発現されてタンパク質として存在することにより微生物体内で効率良く α サブユニットを生産することができると考えられる。したがって、本発明のDNAは、前記DNA以外にも、配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNAを含んでもよい。

上記のような配列番号3に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法又は突然変異処理等の方法によって取得することができる。変異が導入されたDNAがコードするタンパク質のGDH活性は、例えば次のようにして測定することができる。

594 μ Mのメチルフェナジンメトサルフェート(mPMS)および5.94 μ Mの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に、酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え、37℃でインキュベートする。DCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度により、酵素反応速度とする。

さらに、配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号2386以降の塩基配列は、 β -サブユニットをコードしていると推定される。また、塩基番号2386～2451の塩基配列は、 β -サブユニットのシグナルペプチドをコードしていると推測される。同シグナルペプチドの推定されるアミノ酸配列は、配列番号4のアミノ酸番号1～22のアミノ酸配列である。シグナルペプチドは、リボソームで合成されたタンパク質が膜を通過して分泌される際に必要なペプチドであり、15～30残基の疎水性アミノ酸残基から成ることが判明されている。よってシグナルペプチドの存在によって、培養上清中に含有するタンパク質量が増加するため、タンパク質の製造方法において有効に作用するペプチドである。

以下に、本発明のDNAを取得する方法を例示する。

ブルクホルデリア・セパシア等の微生物から染色体DNAを分離、精製した後、染色体DNAを超音波処理、制限酵素処理等を用いて切断したものと、リニアな発現ベクターとをDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。得られた組換えベクターを、同ベクターが自律複製可能な宿主微生物に移入した後、形質転換体をベクターのマーカーと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、GDHをコードする遺伝子を含有する組換えベクターを保持する微生物を得る。得られた微生物が持つ組換えベクターには、少なくとも α サブユニットをコードする塩基配列が含まれていると予想される。また、クローン化断片が十分な大きさを有していれば、 γ サブユニットをコードする塩基配列も含まれている可能性が高い。

次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからGDHをコードする遺伝子を採取することができる。例えば、遺伝子供与体である染色体DNAは、具体的には以下のようにして採取される。

前記遺伝子供与微生物を、例えば1～3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりGDH遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム（SDS）等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチ

プレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

上記のようにして得られた溶菌物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。制限酵素は、ベクターの切断末端と適合する末端を生じさせるものを用いてもよく、あるいは任意の制限酵素を用い、切断末端を平滑末端化してベクターと連結してもよい。

クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、Lambda gt10、Lambda gt11などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC18、pUC118、pUC19、pUC119、pTrc99A、pBluescriptあるいはコスミドであるSuperCosIなどが例示される。

クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したGDHをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのライゲーションの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作製する。必要に応じて、ライゲーションの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作製することもできる。

クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるのであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリDH5 α 、XL-1BlueMRなどを用いることができる。

宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポーレーション法などを用いることができる。

上記の方法により得られたクローン化断片がGDHをコードしていることは、同断片の塩基配列を常法により解読することによって確認することができる。

上記のように得られた形質転換体から、組換えベクターを回収すれば、本発明のDNAが得られる。

本発明のDNA又は同DNAを含む組換えベクターを保持する形質転換体を培養して、同DNAの発現産物としてGDHを産生させ、これを菌体又は培養液から採取することにより、GDHを製造することができる。その際、本発明のDNAは、 α サブユニットをコードするDNAであってもよいが、さらに γ サブユニットを α サブユニットとともに発現させることによって、発現効率を高めることができる。

GDHを産生させる微生物としては、大腸菌をはじめとする腸内細菌群、シュードモナス属やグルコノバクター属などのグラム陰性細菌、バチルス・サブチリス等のバチルス属細菌をはじめとするグラム陽性細菌、サッカロマイセス・セレビシエ等の酵母、アスペルギルス・ニガー等の糸状菌が挙げられるが、これらに限らず、異種タンパク質生産に適した宿主微生物であれば用いることができる。

一度選択されたGDH遺伝子を保有する組換えベクターより、微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、GDH遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりGDH遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによる微生物の形質転換は、例えばエシェリヒア属細菌ではカルシウム処理によるコンピテントセル法、バチルス属細菌ではプロトプラスト法、酵母ではKU法やKUR法、糸状菌ではマイクロマニピレーション法等の方法によって行うことができる。また、エレクトロポーレーション法も広く用いることができる。

宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとGDH活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつ

GDHを生成する微生物を選択すればよい。

形質転換体の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ビルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

培養温度は菌が生育し、GDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、GDHが最高収量に達する時期を見計らって適當時期に培養を完了すればよく、通常は12～72時間程度である。培地のpHは菌が発育し、GDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0～9.0程度の範囲である。

培養物中のGDHを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、GDHが培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、GDH含有溶液と微生物菌体と分離した後に利用される。GDHが菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加してGDHを可溶化し、水溶液として分離採取する。

上記のようにして得られたGDH含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交

換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを適宜組み合わせることによって精製することができる。を行うことにより、精製されたGDHを得ることができる。

カラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動（SDS-PAGE）的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましいが、 γ サブユニットが含まれていても良い。

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。

また、後記実施例に示す α サブユニットのアミノ酸配列と同様にして β サブユニットのアミノ酸配列を決定し、 β サブユニットをコードするDNAを単離することができる。また、得られたDNAを用いて、 β サブユニットを製造することができる。さらに、 α サブユニットをコードするDNA及び β サブユニットをコードするDNAを用いて、多量体酵素を製造することもできる。

<4>本発明のグルコースセンサ

本発明のグルコースセンサは、本発明の酵素（前記多量体酵素もしくはペプチド酵素、又は γ サブユニットが含まれる前記多量体酵素もしくはペプチド酵素）、本発明の形質転換体、又は本発明の微生物（ブルクホルデリア・セパシアKS1株）を、酵素電極として用いることを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明のグルコース脱水素酵素をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

グルコースの濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、メディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いるこ

とができる。作用電極として本発明の酵素を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコースの濃度を計算することができる。

<5>本発明のグルコースアッセイキット

本発明の糖類アッセイキットは、本発明の酵素（前記多量体酵素もしくはペプチド酵素、又は γ サブユニットが含まれる前記多量体酵素もしくはペプチド酵素）を含むことを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明の酵素を少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の酵素に加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作成のためのグルコースなどの標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う酵素は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明酵素のNative PAGE電気泳動による分子量を示す図である。

図2は、本発明酵素のSDS-PAGE電気泳動による分子量を示す電気泳動写真である。

図3は、本発明酵素の至適反応温度（a）、及びの熱安定性（b）を示す図である。

図4は、本発明酵素の α サブユニットのみを構成するペプチド酵素の至適反応温度（a）、及び熱安定性（b）を示す図である。

図5は、熱処理前のグルコース非存在下とグルコース存在下での本発明酵素の分光光度解析（a）、及び熱処理後のグルコース非存在下とグルコース存在下での本発明酵素の分光光度解析（b）を示す図である。

図6は、形質転換体から得られるGDHによるグルコースセンサを用いた各温度のグルコースに対する応答を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

実施例 1 グルコース脱水素酵素の生産能を有する菌の取得

〔スクリーニング〕

本発明の微生物は、日本の種々の温泉の近くの土壌を入手し、その土壌中より、グルコースを栄養源とする細菌の中からグルコースデヒドロゲナーゼ活性を示すものを選択して入手した。

この株の形態学的性質、生育特性、生理学特性を調べた結果を次に示す。

菌学的性質；

グラム染色	陰性
細胞の形状	桿菌
極性鞭毛を持つ	
運動性	陽性
フラグメントの数	> 5
至適増殖温度	45℃
オキシダーゼ	陰性
カタラーゼ	陽性
アセトインの生成	陰性
H ₂ Sの生成	陰性
インドールの生成	陰性
グルコースからの酸	陽性
アルギニンジヒドロラーゼ	陰性
ウレアーゼ	陰性
β-グルコシダーゼ	陰性
プロテアーゼ	陰性
β-ガラクトシダーゼ	陽性
リジンカルボキシラーゼ	陰性

オリニチンカルボキシラーゼ
硝酸塩の還元

陰性

陽性

〔資化性〕

グリセロール	陽性
エリトリトール	陰性
D-アラビノース	陰性
L-アラビノース	陽性
リボース	陽性
D-キシロース	陽性
L-キシロース	陰性
アドニトール	陽性
β -メチル-キシロシド	陰性
ガラクトース	陽性
D-グルコース	陽性
D-フルクトース	陽性
D-マンノース	陽性
L-ソルボース	陰性
ラムノース	陰性
ズルシトール	陽性
イノシトール	陽性
マンニトール	陽性
ソルピトール	陽性
α -メチル-D-マンノシド	陰性
α -メチル-D-グルコシド	陰性
N-アセチル-グルコサミン	陽性
アミグダリン (Amygdaline)	陰性
アルブチン	陰性
エスクリン	陰性

サリシン	陰性
セロビオース	陰性
マルトース	陰性
ラクトース	陰性
メリビオース	陰性
サッカロース	陰性
トレハロース	陽性
イヌリン	陰性
メレチトース	陰性
D-ラフィノース	陰性
アミドン (Amidon)	陰性
グリコーゲン	陰性
キシリトール	陽性
β -ゲンチオビオース	陰性
D-チュラノース	陰性
D-リキソース	陰性
D-タガトース	陰性
D-フコース	陰性
L-フコース	陰性
D-アラビトール	陽性
L-アラビトール	陽性
グルコン酸	陽性
2-ケトグルコン酸	陽性
5-ケトグルコン酸	陰性
カプリン酸	陽性
アジピン酸	陽性
リンゴ酸	陽性
クエン酸	陽性
フェニルアセテート	陽性

〔酸化性〕

グリセロール	陰性
エリトリトール	陰性
D-アラビノース	陰性
L-アラビノース	陽性
リボース	陽性
D-キシロース	陽性
L-キシロース	陰性
アドニトール	陽性
β -メチル-キシロシド	陰性
ガラクトース	陽性
D-グルコース	陽性
D-フルクトース	陽性
D-マンノース	陽性
L-ソルボース	陰性
ラムノース	陰性
ズルシトール	陽性
イノシトール	陽性
マンニトール	陽性
ソルピトール	陽性
α -メチル-D-マンノシド	陰性
α -メチル-D-グルコシド	陰性
N-アセチル-グルコサミン	陰性
アミグダリン (Amygdaline)	陰性
アルブチン	陰性
エスクリン	陽性
サリシン	陰性
セロピオース	陽性

マルトース	陽性
ラクトース	陽性
メリピオース	陰性
サッカロース	陰性
トレハロース	陽性
イヌリン	陰性
メレチトース	陰性
D-ラフィノース	陰性
アミドン (Amidon)	陰性
グリコーゲン	陰性
キシリトール	陰性
β -ゲンチオピオース	陽性
D-チュラノース	陰性
D-リキソース	陰性
D-タガトース	陰性
D-フコース	陽性
L-フコース	陰性
D-アラビトール	陽性
L-アラビトール	陽性
グルコン酸	陰性
2-ケトグルコン酸	陰性
5-ケトグルコン酸	陰性

上記の菌学的性質を有するK S 1株の分類学上の位置をバージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)を参照して検討すると、ブルクホルデリア属に属し、ブルクホルデリア・セバシアである菌株と同定された。

尚、ブルクホルデリア属は、従来シュードモナス属に分類されていたが、現在ではブルクホルデリア属に分かれている (Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu,

H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M., Microbiol. Immunol. Vol36(12), 1251-1275, 1992; International Journal of Systematic Bacteriology, Apr, 1993, p398-399)。

また、本発明者らはブルクホルデリア・セパシア KS 1 株以外の株について、財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka) 又は理化学研究所微生物系統保存施設 (Japan Collection of Microorganisms, JCM) に寄託されているブルクホルデリア・セパシアのいくつかの菌株を取り寄せてグルコース脱水素酵素活性を測定したところ、同活性を有することを確認した。グルコース脱水素酵素活性は、後述の実施例 2 に記載の方法により測定した。KS 1 株の水溶性画分の酵素活性を 100 としたときの相対活性を表 1 に示す。

表 1

菌株		グルコース脱水素酵素活性	
		70℃	45℃
KS1	水溶性画分	100	100
JCM5506	水溶性画分	100	100
	膜画分	100	100
JCM5507	水溶性画分	100	100
	膜画分	100	100
JCM2800	水溶性画分	100	100
JCM2801	水溶性画分	100	100
IFO15124	水溶性画分	100	100
IFO14595	水溶性画分	100	100

実施例 2 グルコース脱水素酵素の抽出

<1> 菌体の培養

本細菌の培養条件は通常通りの好氣的培養条件が用いられる。培養液 1 L 中に以下の成分を含む培地 7 L で、34℃、8 時間、培養した。

ポリペプトン	10 g
酵母抽出液	1 g

NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
グルコース	5 g
Einol (ABLE Co. 東京 日本)	0.14 g
Total、蒸留水	1 L
pH調製	7.2

本培養液 7 L を 4℃、10 分間、9,000 × g で遠心分離し、約 60 g の菌体を得た。

<2>粗精製フラクションの作製

60 g の菌体を 10 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) に分散し、フレンチプレス (大竹製作所 東京 日本) で 1,500 Kg/cm² の圧力差を加えて、菌体膜を破壊した。細胞抽出液を 8,000 × g で 10 分間、遠心分離し、細胞固形物を除いた。さらに、その上清を、4℃ で 69,800 × g で 90 分間、超遠心し、沈殿物としての膜フラクション、約 8 g を得た。

<3>酵素の精製

膜フラクションを、最終濃度で Triton-X100 が 1% になるように、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) で再分散した。そして、4℃、一晚、ゆっくり攪拌した。超遠心後 (4℃、69,800 g、90 分間)、可溶化膜フラクションを、4℃ で、15000 × g で 15 分間、再遠心し、上清を得た。

その可溶化膜フラクションに、同量の 0.2% Triton-X100 を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) を加えた。透析後、その溶液を、0.2% Triton-X100 を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) で等量化された DEAE-TOYOPEARL カラム (22mm ID × 20 cm 東ソー 東京 日本) に供給した。タンパク質を、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) 中の NaCl の濃度が 0 ~ 0.15 M になるように、直線的グラジエントで溶出した。その流速は 5 ml/min で行った。GDH は約 75 mM の NaCl 濃度で溶出された。GDH 活性をもつフラクションを集め、0.2% Triton-X100 を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0 4℃) で一夜、透析した。

さらに透析調製酵素液を、DEAE-5PWカラム（8.0mm ID×7.5cm 東ソー、東京、日本）に通した。そのカラムは予め、0.2% Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）で平衡化されている。タンパク質を、10mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）中のNaClの濃度が0～100mMになるように、直線的グラジエントで溶出した。その流速は1ml/minで行った。GDH活性のあるフラクションが約20mMのNaCl濃度で溶出した。GDH活性をもつフラクションを集め、0.2% Triton-X100を含む10mMリン酸カリウム緩衝液（pH 8.0）で、一夜、脱塩し、本精製酵素を得た。

尚、GDHの活性測定は、本実施例及び以下の実施例を通して、以下の方法に従い行った。

電子受容体として、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール（DCIP）及びフェナジメトサルフェート（PMS）を用いた。反応はポリエチレンチューブ内で所定の温度で実施した。0.75mM PMSと0.75mM DCIP含有25mM トリスHCl緩衝液 pH 8.0 20μlに酵素溶液5μlを添加した。この混合液を1分間事前定温放置した。2M グルコース1μl（最終濃度：77mM）の添加により反応を開始させ、2分間定温放置した。次に氷冷蒸留水100μlまたは7.5M尿素120μlを添加して試料を冷却した。超微量計測用セル（100μl）及びこれを用いて計測できる分光光度計（UV160、島津製作所、京都、日本）を用いて、グルコースの脱水素化に基づく、電子受容体の還元反応を追跡した。すなわちDCIP還元にもとづく退色を、DCIPの吸収波長である600nmを時間とともに計測した。DCIPのモル吸光係数（ $22.23\text{mM} \times \text{cm}^{-1}$ ）を用いた。酵素1単位（U）は標準検定条件下で1分ごとに1μMグルコースを酸化する量と定義した。タンパク濃度はローリー法で測定した。

実施例 3

本精製酵素について、Native PAGE電気泳動を実施した。本電気泳動の条件は、1% Triton-X100を含むTris-Alanine緩衝液システムを用いた8-25% ポリアクリルアミドグラジエントゲル上で実施した。そのゲルは硝酸銀で染色を行った。タンパク質マーカーとして、チログロブリン（Thyroglobulin）：669kDa、

フェリチン (Ferritin) : 440kDa、カタラーゼ (Catalase) : 232kDa、アルドラーゼ (Aldolase) : 158kDa、ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin) : 67 kDa、オバルブミン (Ovalbumin) : 43kDa、キモトリプシノーゲン (ChymotrypsinogenA) : 25kDa、のタンパク質を用いた。

また、そのNative PAGEゲルについて、活性染色を実施した。本ゲルを以下の溶液中に30分間インキュベーションする事により行った。GDHの活性部位はニトロブルーテトラゾリウムが還元され、ホルマザンが生成し、暗紫色に発色した。

2.00 mM	グルコース
0.1 mM	ニトロブルーテトラゾリウム
0.3 mM	フェナジンメトサルフェート
20 mM	Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)

Native PAGEの銀染色の結果より、本酵素は単一酵素であること、その分子量は約400kDaであることが推測された。また、同ゲルを活性染色すると、銀染色と同様の移動度の部位に活性が認められた(図1参照。図中、レーン1は分子量標準マーカートンパク質の銀染色を、レーン2は本酵素の銀染色を、レーン4は、本酵素の活性染色を示す)。本酵素を70℃で30分間、熱処理をすると、以外にも活性は残存し、分子量85kDa付近に活性をもつタンパク質に分離した(図1参照。図中、レーン3は70℃、30min、熱処理された本酵素の銀染色を、レーン5は70℃、30min、熱処理された本酵素の活性染色を示す)。このことは本酵素がサブユニットからなる事を示唆している。

実施例 4

本精製酵素液をSDS-PAGEで電気泳動を行った。SDS-PAGEはTris-Tricine緩衝液を用いて8-25%ポリアクリルアミドの勾配ゲル中で実施した。そのゲルのタンパク質は硝酸銀で染色を行った。Phast System(Pharmacia)により、分離と展開を自動的に行った。標準タンパクの相対移動度により分子質量を測定した。SDS-PAGE電気泳動によって、本酵素は約60kDaと43kDaのタンパク質に分離した(図2参照。図2は電気泳動写真である。図中、レーン1は分子量標準マー

カータンパク質の硝酸銀染色を、レーン2は本酵素の硝酸銀染色を示す)。従って、本酵素は60 kDaの α -サブユニットと43 kDaの β -サブユニットが結合していることが示唆され、かつ、それらが4個結合した8量体を形成していることが予想された。

SDS-PAGEで分離された43 kDaのタンパク質である β -サブユニットをポリビニリデンフルオリド膜に転写した後、アミノ酸シーケンサー（島津製作所、P P S Q-10）により β -サブユニットのN末端アミノ酸配列の決定を行った。その結果、本タンパク質のN末端アミノ酸配列は配列番号5のアミノ酸配列からなる16残基から構成されていることが明かとなった。

また、本酵素を70℃で30分間、熱処理した場合の結果を図2中レーン3で示す。このSDS-PAGEの結果から熱処理後この酵素は分子量60 kDaの単一ポリペプチドに変わったことが想定できる。

実施例 5

本酵素のゲルろ過クロマトグラフィーを実施した。ゲルとして、TSK gel G 3000 SW（東ソー（株）製）を用い、ゲルカラムは（8.0 mm ID × 30 cm 東ソー、東京、日本）、10 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）中の0.3 M NaClと0.1 % Triton-X100を含む溶液で平衡化されている。フラクション（125 μ l）を集めた。7つのタンパク質マーカーを本精製酵素の分子量を決定するために用いた。タンパク質マーカーとして、チログロブリン（Thyroglobulin）：669 kDa、フェリチン（Ferritin）：440 kDa、カタラーゼ（Catalase）：232 kDa、アルドラーゼ（Aldolase）：158 kDa、ウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin）：67 kDa、オバルブミン（Ovalbumin）：43 kDa、キモトリプシノーゲン（Chymotrypsinogen A）：25 kDa、を用いた。

本酵素の分子量は約380 kDaであることが、確認された。

実施例 6

精製した本酵素の至適温度を調べた。

Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0 中で、あらかじめ1分間設定温度でイン

キュベーションした後、反応を開始した。所定の反応温度で活性を測定した。至適温度は45℃付近にみられた（図3（a）参照）。また、45℃付近に比べて活性は低い、75℃付近にもピークがみられた。

また、本酵素の熱安定性を調べるため、各温度で30分間定温放置後、45℃で残存酵素活性を測定した（図3（b）参照）。

実施例 7

本酵素を70℃で30分間熱処理した場合の分子量60 kDaの単一オリゴペプチドを構成する該ペプチド酵素の至適温度及び熱安定性を調べた。

このペプチド酵素は非熱処理酵素よりも高い至適温度を示し、さらに熱安定性も示した。このような温度依存性を示す酵素の報告は未だない。

Tris-HCl緩衝液、pH 8.0中で、あらかじめ1分間設定温度でインキュベーションした後、反応を開始した。所定の反応温度で活性を測定した。至適温度は75℃付近にみられた（図4（a）参照）。

また、本酵素の熱安定性を調べるため各温度で30分間定温放置後、70℃で残存酵素活性を測定した（図4（b）参照）。

実施例 8

それぞれのサブユニットの役割を調査するために、熱処理前後のGDHの分光光度解析を行った。図5（a）（b）は、熱処理前後の（グルコースの存在下で）酸化型及び還元型のGDHの吸収を示している。もともとのGDHである熱処理前の酸化GDHの波長は、409nmに特徴的なピークを示し、また、グルコースの存在下でそれは417nmへと移行し、523nm及び550nmに2つのさらなるピークが見られた（図5 a）。対照的に、熱処理後では409nmにおける特徴的なピークが見られなくなり（図5 b）、酸化型及び還元型の間に重要な違いが見られなかった。

熱処理前の酸化型GDH、もともとのGDH、の吸収波長はGluconobacter sp.あるいはAcetobacter sp.のデヒドロゲナーゼチクローム複合体でできているアルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの吸収波長と類

似していた（以下の文献参照。Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K. and Ameyama, M. (1978) *Agr. Biol. Chem.*, 42, 2045-2056.; Adachi, O., Miyagawa, E., Matsushita, K. and Ameyama, M. (1978) *Agr. Biol. Chem.*, 42, 2331-2340; Ameyama, M. and Adachi, O., (1982) *Methods Enzymol.*, 89, 450-457; Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K. and Ameyama, M. (1980) *Agr. Biol. Chem.*, 44, 503-515; Ameyama, M. and Adachi, O. (1982) *Methods Enzymol.*, 89, 491-497)。

結果として、本GDHのオリゴマー複合体はチトクロームを含んでいる可能性を示唆していた。従って、観察されたチトクロームC様の波長は β サブユニットに起因するもので、熱処理の間に失われたものと言える。ゆえに β サブユニットはチトクロームCからなっているといえる。

実施例 9

実施例 4 の電気泳動によって得られた β サブユニットを含むバンドを切り取り、ペプチドシーケンサー（島津製作所、PPSQ-10）によりアミノ酸配列を解析したところ、配列番号 5 に示すN末端の 16 残基のアミノ酸配列を得ることができた。

前記N末端の 16 残基のアミノ酸配列から同ペプチド配列をコードする遺伝子領域をPCRにより増幅することを試みた。すなわち、16 残基のペプチド鎖のN末端 5 残基に相当するフォワード側の塩基配列（配列番号 6）及び同C末端 5 残基のアンチセンス鎖に相当するリバース側の塩基配列（配列番号 7）を持つ 2 つのPCRプライマーをデザインした。この 1 組のPCRプライマーを用い常法に従いKS1株のゲノムに対してPCRを行なったところ、約 50 bp の遺伝子断片が増幅された。これを常法に従いその塩基配列を決定したところ、上記PCRプライマー 1 組を含む塩基配列 58 塩基が解読された。このうち、PCRプライマーを除く 18 塩基について解析していたところ、前記 β サブユニットN末端 16 残基のN末側から 6 残基目のProから 11 残基目のArgに相当する遺伝子配列（配列番号 8）が見出され、本増幅遺伝子断片が β サブユニットの遺伝子断片を含むことが明らかとなった。

又、 β -サブユニットは、 α -サブユニットに続く22アミノ酸残基の後に存在することが分かった。これは、実施例4において決定した、精製された β -サブユニットのN末端におけるアミノ酸配列と、配列番号1中の塩基番号2452～2466の塩基配列によって翻訳される5アミノ酸残基が一致することから、両者が同一であると判明したに基づいている。

又、配列番号1中の塩基番号2386～2451の塩基配列は、 β -サブユニットのシグナルペプチドであることが推測される。この塩基配列によってコードされるアミノ酸配列は、配列番号4のアミノ酸配列のアミノ酸番号1～22に相当する。

実施例10

0.1% Triton X-100及び1mM CaCl_2 を含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)中に本精製酵素及び市販のNAD補酵素GDH(NAD-GDHと略す)をそれぞれ100U/Lになるように加え混和した。この溶液を60℃の高温槽にいれ、残存活性を測定した。

表2 残存相対活性(%)

時間(分)	NAD-GDH	本酵素GDH
0	100	100
15	20	100
30	5	100

本酵素は現在市販されているGDH酵素に比べて、驚異的な熱安定性があることが確認できた。本酵素は市販のNAD-GDHとは全く別の新規な酵素であることが判明した。

実施例10 GDH α サブユニットをコードする遺伝子の単離

<1>ブルクホルデリア・セバシア KS1株からの染色体DNAの調製

ブルクホルデリア・セバシア KS1株より染色体遺伝子を常法に従って調製した。

すなわち、同菌株をTL液体培地(ポリペプトン 10g、酵母抽出液 1g、NaCl 5g、 KH_2PO_4 2g、グルコース 5g; 1L、pH 7.2)を用いて、34℃で一晩振盪した。増殖した菌体を遠心分離機により回収した。この菌体を10mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、0.5% SDS、100 $\mu\text{g/ml}$ のプロテイナーゼKを含む溶液に懸濁し、50℃で6時間処理した。ここに等量のフェノールクロロホルムを加えて室温で10分間攪拌した後、遠心分離機により上清を回収した。これに終濃度0.3Mになるように酢酸ナトリウムを加え、2倍量のエタノールを重層して中間層に染色体DNAを析出させた。これをガラス棒を用いてすくいとり、70%エタノールで洗浄した後、適当量のTEバッファーに溶解させ、染色体DNA溶液とした。

<2> GDH α サブユニットのN末端アミノ酸配列の決定

実施例2と同様にして精製したGDHを凍結乾燥によって濃縮後、12.5%ポリアクリルアミドを用いたSDS-電気泳動法を用いて展開し、 α サブユニットを分離した。こうして得られた α サブユニットをポリビニリデンフルオリド膜に転写した後、アミノ酸シーケンサー(島津製作所製、PPSQ-10)によりN末端アミノ酸配列の決定を行った。その結果、本酵素には配列番号3のアミノ酸配列においてアミノ酸番号2~12からなる11残基から構成されるペプチド配列を含むことが明らかとなった。

<3> α サブユニットをコードする遺伝子のクローニング

<1>で調製したDNA 1 μg を制限酵素Sau3AIで限定分解した。これをCIAP(仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ)処理した。一方、コスミドであるSuperCosI(ストラジーン社から入手)をBamHI処理し、T4 DNAリガーゼにより、SuperCosIに α -15株由来の染色体DNA断片をSau3AIで限定分解して得られたDNA断片を組み込んだ。得られた組換えDNAでエシェリヒア・コリXL-1 Blue MR(ストラジーン社から入手)を形質転換した。形質転換体はSuperCosI上の抗生物質耐性であるネオマイシン耐性およびアンピシリン耐性にしたがって10 $\mu\text{g/ml}$ のネオマイシンおよび25 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含むLB寒天培地から選抜した。得られた形質転換体をLB液体培地で培養した。これらの形質転換菌体を集菌後、GDH活性測定試薬に懸濁し、グルコースに対する脱水素酵素活性を指標にクローンを選抜

した。その結果、1株のグルコース脱水素酵素活性を示すクローンが得られた。

<4>サブクローニング

<3>で得られた α サブユニットをコードする遺伝子を含むコスミドSuperCos Iから、目的遺伝子を含むDNA断片を調製した。同コスミドから挿入遺伝子断片を制限酵素NotIにより切り出した。このDNA断片を制限酵素XbaIで処理し、それらの断片をXbaIで消化したプラスミドpUC18に組み込んだ。各挿入断片を含むプラスミドpUC18でエシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。得られた形質転換体を液体のLB培地で培養し、それぞれの細胞のGDH活性を<3>と同様に調べた。その結果、一つの形質転換体にGDH活性を示す株が得られた。この形質転換体からプラスミドを抽出し、その挿入DNA断片を解析したところ、約8.8kbpの挿入断片が確認された。本プラスミドをpKS1と命名した。

<5>塩基配列の決定

pKS1の挿入DNA断片について、制限酵素解析及び常法に従い塩基配列を決定した。その結果、本挿入DNA断片中に、<2>で明かとなった α サブユニットのN末端アミノ酸配列をコードするDNA配列が確認され、この配列を含むオープンリーディングフレームが見つかった。決定した塩基配列および同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列は、配列番号1および3に示す通りである。アミノ酸配列から求められるタンパク質の分子量は59,831Daであり、ブルクホルデリア・セバシアKS1株 α サブユニットのSDS-PAGEでもとめられた分子量60kDaにほぼ一致した。

α サブユニットの塩基配列が決定されたことにより、前記 α サブユニットの構造遺伝子を用いてベクターを作製し、更に前記ベクターにより形質転換体の製造を行った。

先ずベクターに挿入する遺伝子を以下のように調製した。

KS1株由来のゲノム断片をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むように、PCR反応により増幅した。PCR反応には次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

(フォワード)

5'-CCCAAGCTTGGGCCGATACCGATACGCA-3' (配列番号 9)

(リバース)

5'-GAGAAGCTTTCCGCACGGTCAGACTTCC-3' (配列番号 10)

PCRにより増幅された遺伝子を制限酵素HindIIIで消化した後、発現ベクターpFLAG-CTS (SIGMA社) のクローニング部位であるHindIII部位に挿入した。得られたプラスミドをpFLAG-CTS/ α と命名した。

前記プラスミドpFLAG-CTS/ α でエッシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。

さらにpKS1挿入断片について、 α サブユニットの上流に関してオープンリーディングフレームを検索したところ、新たに配列番号2に記載される168アミノ酸残基から構成されるポリペプチドをコードする507塩基から構成される構造遺伝子(配列番号1中塩基番号258~761)が見出された。この構造遺伝子は、 γ サブユニットをコードしていると考えられた。

α サブユニットのコード領域の上流に、 γ サブユニットをコードする領域の存在が明らかになったことから、 γ サブユニットと α サブユニットが連続するポリシストロン構造の遺伝子を含む組換えベクターを作製し、同ベクターを導入した形質転換体を構築した。

先ずベクターに挿入する遺伝子を以下のように調製した。

γ サブユニットの構造遺伝子および α サブユニットの構造遺伝子が連続するKS1株由来のゲノム断片をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むように、PCR反応により増幅した。PCR反応には次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

(フォワード)

5'-CATGCCATGGCACACAACGACAACACT-3' (配列番号 11)

(リバース)

5'-CCCAAGCTTGGGTCAGACTTCCTTCTTCAGC-3' (配列番号 12)

このPCRにより増幅された遺伝子の5'末端をNcoI、3'末端をHindIIIで消化した後、ベクターpTrc99A (Pharmacia社) のクローニング部位である、NcoI/HindIIIに挿入した。得られたプラスミドをpTrc99A/ $\gamma + \alpha$ と命名した。

前記プラスミドpTrc99A/ $\gamma + \alpha$ により、エシェリヒア・コリDH5 α MCR株を形質転換し、アンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地で生じるコロニーを採取した。

実施例11 組換え大腸菌によるGDH α サブユニットの生産

前記pKS1、pFLAG-CTS/ α 、pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ のそれぞれのプラスミドによって形質転換した大腸菌エシェリヒア・コリDH5 α MCR株を用いて α サブユニットの生産を行った。各形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB培地3mlに植菌し、37℃で12時間培養を行い、遠心分離機により細胞を集菌した。この細胞をフレンチプレス(1500kgf)で破碎した後、超遠心(4℃、160,400 \times g、90分)により膜画分(10mMリン酸カリウム緩衝液pH6.0)を分離した。

実施例12 グルコースのアッセイ

先ず前記各膜分画を用いてGDH活性の確認を行った。具体的には594 μ Mのメチルフェナジンメトサルフェート(mPMS)および5.94 μ Mの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)により、目視判定を行った。結果は以下のとおりである。+の数は、青色から無色への変化の程度を表す。

pFLAG-CTS/ α による形質転換体培養膜分画	+
pKS1による形質転換体培養膜分画	++
pTrc99A/ $\gamma + \alpha$ による形質転換体培養膜分画	+++

α サブユニットのみを組みこんだpFLAG-CTS/ α による形質転換体培養膜分画のGDH活性が最も低く、効率良くベクターを構築したpTrc99A/ $\gamma + \alpha$ による形質転換体培養膜分画が最も高いGDH活性を示した。

α サブユニットの構造遺伝子のみによるベクターを用いた形質転換体でも α サブユニットは発現されるが、更に γ サブユニットの構造遺伝子を α サブユニット

の構造遺伝子と合わせたベクターを用いることにより、効率良く α サブユニットを得ることができた。

本発明のグルコース脱水素酵素を用いてグルコースをアッセイした。本発明のグルコース脱水素酵素(α サブユニット)を、各種濃度のグルコースで酵素活性を測定した。GDH活性の測定は594 μ Mのメチルフェナジンメトサルフェート(mPMS)および5.94 μ Mの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)の中で行った。酵素試料および基質としてグルコースを基質として加え37℃でインキュベートした時のDCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素反応速度とした。本発明のGDHを用いて、0.01~1.0mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた。

実施例 13 グルコースセンサーの作製および評価

実施例2で得られた本発明のグルコース脱水素酵素(25単位)にカーボンペースト20mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で30分間処理した後、20mMリジンを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

前記電極を作用極として、参照極にAg/AgCl、対極にPt電極を用い、グルコース添加による応答電流値を測定した。反応溶液は1mMメトキシPMSを含む10mMリン酸カリウム緩衝液とし、電位100mVを印加し測定を行った。

作製した酵素センサーを用いてグルコースの濃度の測定を行った。本発明のグルコース脱水素酵素を固定化した酵素センサーを用いて、0.05mM~5.0mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた(図6)。

実施例 14 形質転換体から得られるGDHによるグルコースセンサの作製及び評価

実施例12によって得られた本願発明の α サブユニット(249U/mg タンパク質) 10 Uをカーボンペースト50 mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40 mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で30分間処理した後、20 mMリジンを含む10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10 mM MOPS緩衝液(pH 7.0)中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

前記電極を作用極として、参照極にAg/AgCl、対極にPt電極を用い、グルコース添加による応答電流値を測定した。反応溶液は1 mMメトキシPMSを含む10 mMリン酸カリウム緩衝液とし、電位100 mVを印加しながら各濃度のグルコース水溶液を25℃及び40℃で測定を行った。

作製した酵素センサーを用いてグルコースの濃度の測定を行ったところ各濃度に応じた電流が得られたことを確認した。

産業上の利用可能性

本発明により、基質特異性が高く、安価に生産でき、測定サンプルの溶存酸素の影響を受けない酵素であって、特に熱安定性に優れた新規なグルコース脱水素酵素、及び該酵素の製造方法が提供できた。またこの酵素を生産するブルクホルデリア・セバシアの新規菌株が得られた。本酵素及び菌株を含む酵素電極を用いれば、グルコース測定に有効なグルコースセンサも提供できる。

また、本発明によりグルコース脱水素酵素の遺伝子、及び、同遺伝子を効率良く発現させることのできるペプチド及びそのペプチドをコードするDNAが判明したため、前記遺伝子をもとにGDHを組み換えDNA技術で大量に調製することができる。

請求の範囲

1. ブルクホルデリア属に属し、グルコース脱水素酵素を産生する能力を有する微生物を培地に培養し、同培地又は／及び前記微生物菌体からグルコース脱水素酵素を採取することを特徴とするグルコース脱水素酵素の製造方法。

2. 前記微生物がブルクホルデリア・セバシアである請求項1記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

3. 前記グルコース脱水素酵素が下記性質を有することを特徴とする請求項1又は2に記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

①作用：

グルコースの脱水素反応を触媒する。

②還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaと分子量約43kDaを示すサブユニットからなる。

③TSK gel G3000SW（東ソー（株）製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約380kDaを示す。

④至適反応温度：

45℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

4. 前記分子量約43kDaのサブユニットが電子伝達タンパク質であることを特徴とする請求項3記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

5. 前記電子伝達タンパク質がチトクロムCであることを特徴とする請求項4記載のグルコース脱水素酵素の製造方法。

6. ブルクホルデリア属に属する微生物によって産生され得るグルコース脱水素酵素。

7. 前記微生物がブルクホルデリア・セバシアである請求項6記載のグルコース脱水素酵素。

8. 前記グルコース脱水素酵素が下記性質を有することを特徴とする請求項6又は7に記載のグルコース脱水素酵素。

①作用：

グルコースの脱水素反応を触媒する。

②還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60 kDaと分子量約43 kDaを示すサブユニットからなる。

③TSK gel G3000SW（東ソー（株）製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、分子量約380 kDaを示す。

④至適反応温度：

45℃付近（Tris-HCl緩衝液、pH8.0）。

9. 前記分子量約43 kDaのサブユニットが電子伝達タンパク質であることを特徴とする請求項8記載のグルコース脱水素酵素。

10. 前記電子伝達タンパク質がチトクロムCであることを特徴とする請求項9記載のグルコース脱水素酵素。

11. 前記分子量60 kDaのサブユニットが、配列番号3のアミノ酸番号2～12のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項8～10のいずれか一項に記載のグルコース脱水素酵素。

12. 前記43 kDaのサブユニットのN末端が配列番号5のアミノ酸配列を有する請求項8～11のいずれか1項に記載のグルコース脱水素酵素。

13. 前記分子量約60 kDaのサブユニットが以下の（A）または（B）に示すタンパク質である請求項11に記載のグルコース脱水素酵素。

（A）配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（B）配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

14. 45℃付近と75℃付近にそれぞれ活性ピークを有することを特徴とする請求項6記載のグルコース脱水素酵素。

15. 請求項10記載のグルコース脱水素酵素のサブユニットであって、配列番号5のアミノ酸配列を有することを特徴とするチトクロムC。

16. 請求項15記載のチトクロムCの一部をコードし、配列番号8に記載の塩基配列を有するDNA。

17. 請求項15記載のチトクロムCの一部をコードし、配列番号1に記載の塩基配列のうち塩基番号2386～2467の塩基配列を有するDNA。

18. 請求項15記載のチトクロームCのシグナルペプチドをコードし、配列番号1の塩基配列のうち塩基番号2386～2451の塩基配列を含むDNA。

19. チトクロームCのシグナルペプチドであって、配列番号4のアミノ酸配列のうちアミノ酸番号1～22のアミノ酸配列を有するペプチド。

20. 下記性質を有するタンパク質。

①サブユニットとして請求項6記載のグルコース脱水素酵素を構成し得る。

②グルコース脱水素酵素活性を有する。

③還元条件下でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60kDaを示す。

④至適反応温度：

75℃付近 (Tris-HCl緩衝液、pH8.0)。

21. 配列番号3においてアミノ酸番号2～12のアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項20記載のタンパク質。

22. 前記タンパク質が以下の(A)または(B)に示すタンパク質である請求項21記載のグルコース脱水素酵素。

(A) 配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

23. 以下の(A)または(B)に示すタンパク質。

(A) 配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

24. 以下の(A)または(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号3のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号3のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質。

25. 以下の (a) または (b) に示すDNAである請求項24記載のDNA。

(a) 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号764～2380からなる塩基配列又はこの配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グルコース脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

26. 請求項24又は25に記載のDNAを含有する組換えベクター。

27. 請求項18記載のシグナルペプチド及び β -サブユニットをコードする塩基配列を含む請求項26記載の組換えベクター。

28. 請求項24又は25に記載のDNA、又は請求項26又は27に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

29. 請求項28記載の形質転換体を培養して、前記DNAの発現産物としてグルコース脱水素酵素を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素の製造方法。

30. ブルクホルデリア・セバシアKS1株 (FERM BP-7306)。

31. 請求項6～14のいずれか一項に記載のグルコース脱水素酵素、請求項20～23のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項27の形質転換体、又は請求項30に記載の菌株を含む酵素電極を用いたグルコースセンサ。

32. 請求項6～14のいずれか一項に記載のグルコース脱水素酵素、又は請求項20～23のいずれか一項のタンパク質を含むグルコースアッセイキット。

33. 配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質。

34. 配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA。

35. 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～761からなる塩基配列を含む請求項34記載のDNA。

36. 請求項34又は35に記載のDNAと、請求項24又は25に記載のDNAをこの順に含むDNA。

37. 配列番号1の塩基配列のうち、塩基番号258～2380からなる塩基配

列を含む請求項 3 6 記載の DNA。

3 8. 請求項 3 6 又は 3 7 に記載の DNA を含有する組換えベクター。

3 9. 請求項 1 8 記載のシグナルペプチド及び β -サブユニットをコードする塩基配列を含む請求項 3 8 記載の組換えベクター。

4 0. 請求項 3 6 又は 3 7 に記載の DNA 又は請求項 3 8 又は 3 9 に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

4 1. 請求項 4 0 記載の形質転換体を培養して、請求項 3 6 又は 3 7 に記載の DNA の発現物質としてグルコース脱水素酵素を産生させ、これを採取するグルコース脱水素酵素の製造方法。

1 / 6

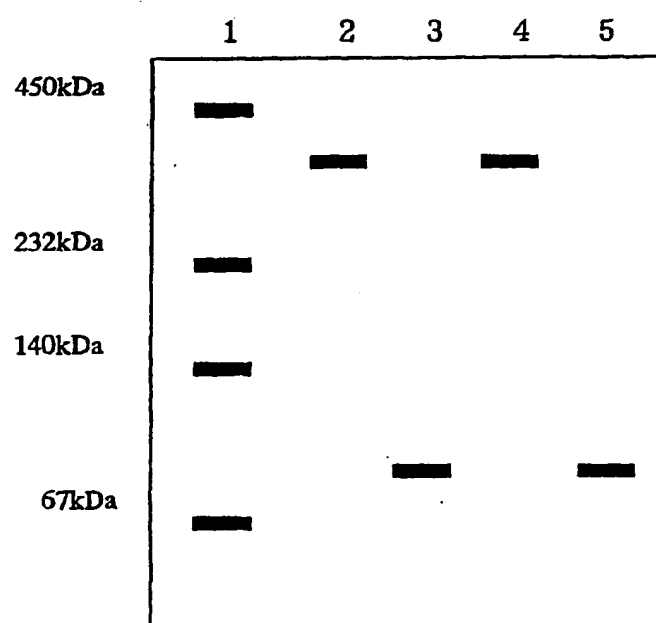


図 1

2 / 6

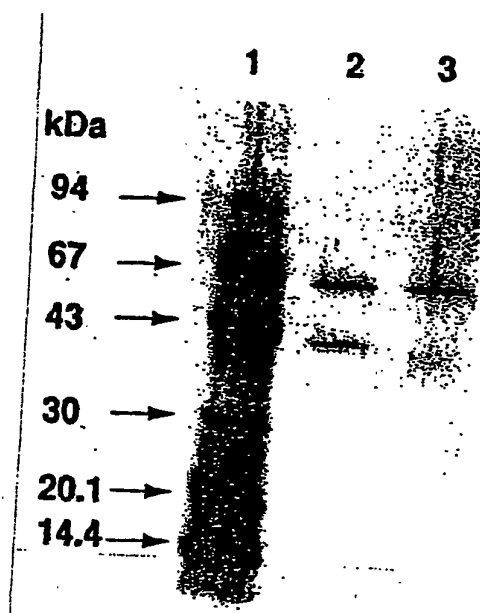


図 2

3 / 6

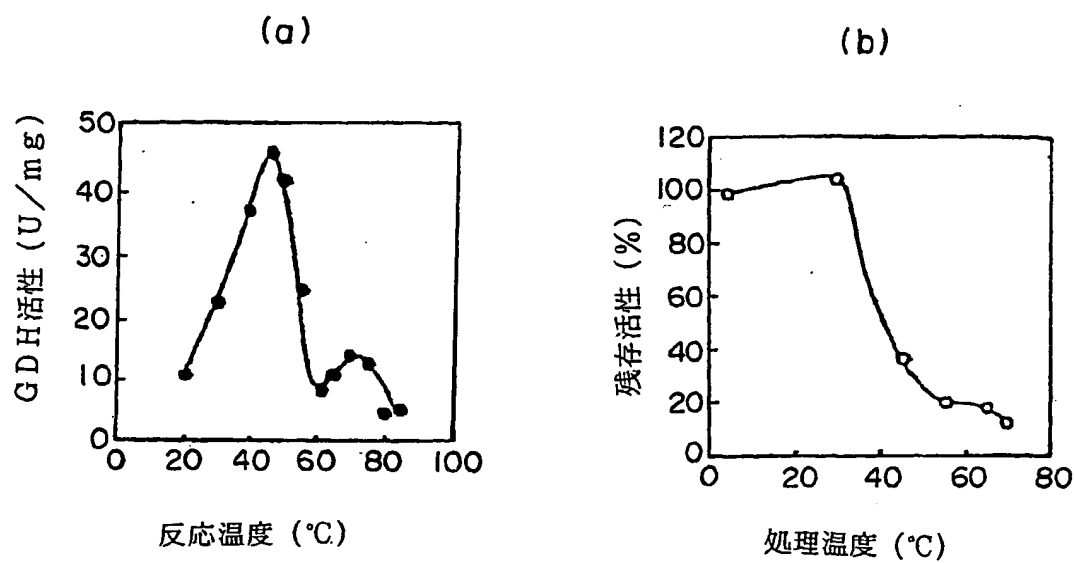


図 3

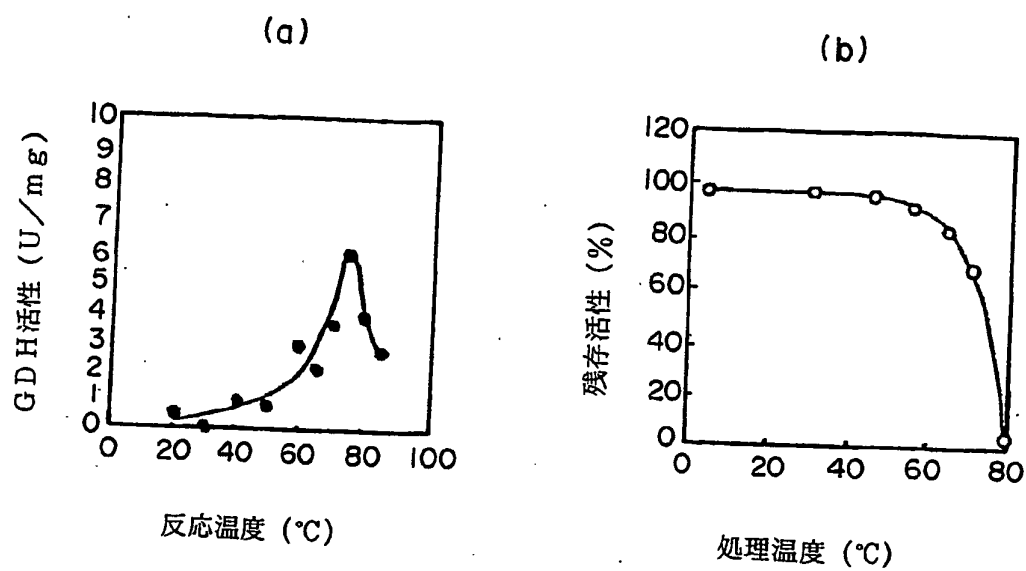


图 4

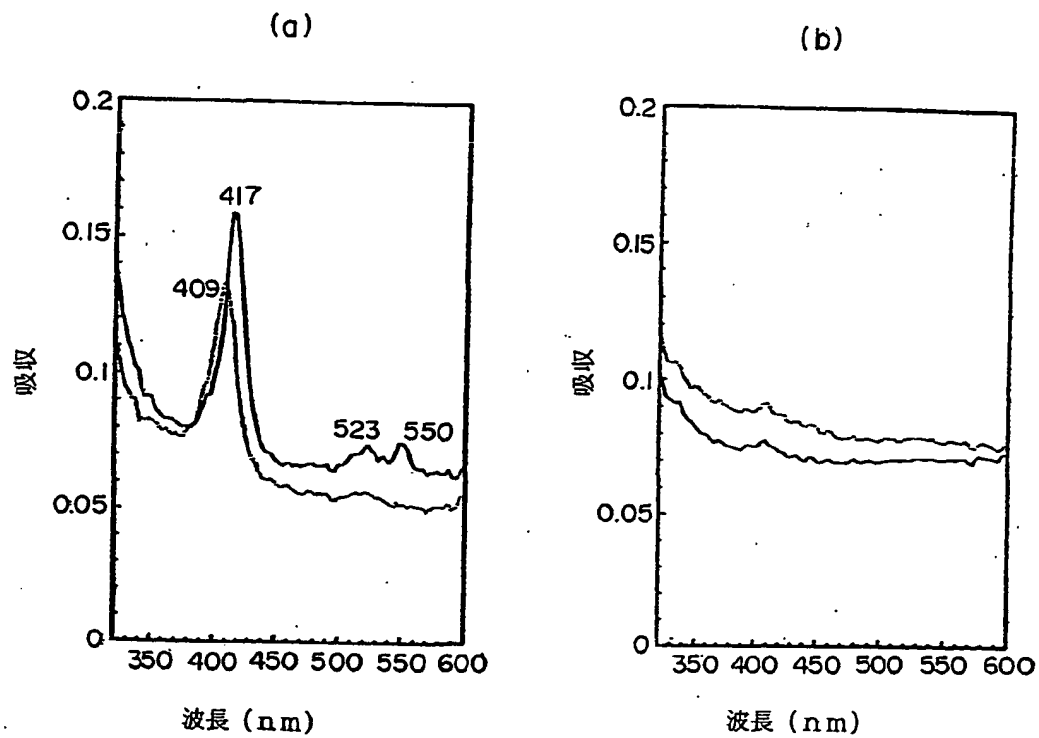


図 5

6/6

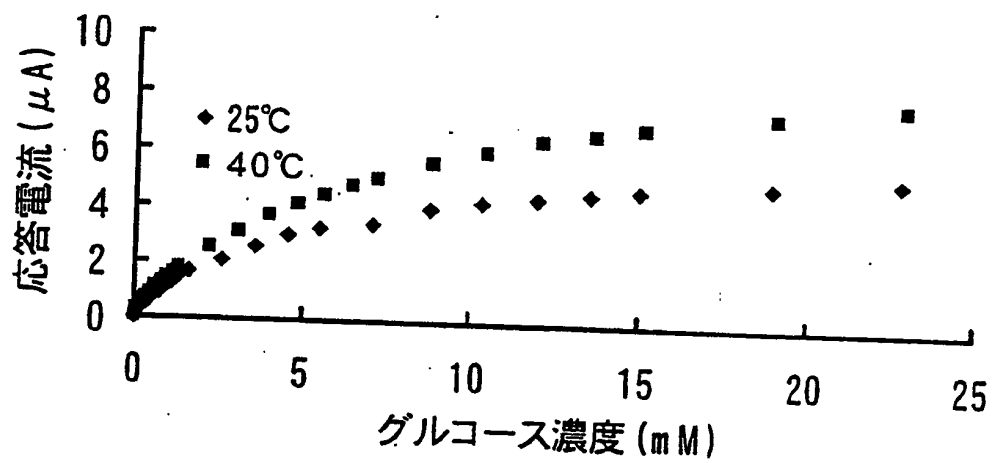


図 6

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> SODE, Koji

<120> 新規グルコース脱水素酵素及び該脱水素酵素の製造方法

<130> K01262

<141> 2001-10-31

<150> JP 2000-332085

<151> 2000-10-31

<150> JP 2000-357102

<151> 2000-11-24

<150> JP 2001-276832

<151> 2001-09-12

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2467

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (258)..(761)

<220>

<221> CDS

<222> (764)..(2380)

<220>

<221> CDS

<222> (2386)..(2466)

<400> 1

aagctttctg ttltgattgca cgcgattcta accgagcgtc tgtgaggcgg aacgcgacat 60
gcttcgtgtc gcacacgtgt cgcgccgacg acacaaaaat gcagcgaaat ggctgatcgt 120

tacgaatggc tgacacatig aatggactat aaaacatig tccgttccgg aatgtgcgcg 180
 tacatticag gtccgcgcgcg atttttgaga aatatcaagc gtggttticc cgaatccggt 240
 gticgagaga aggaaac atg cac aac gac aac act ccc cac tcg cgt cgc 290
 Met His Asn Asp Asn Thr Pro His Ser Arg Arg
 1 5 10
 cac ggc gac gca gcc gca tca ggc atc acg cgg cgt caa tgg ttg caa 338
 His Gly Asp Ala Ala Ala Ser Gly Ile Thr Arg Arg Gln Trp Leu Gln
 15 20 25
 ggc gcg ctg gcg ctg acc gca gcg ggc ctc acg ggt tcg ctg aca ttg 386
 Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Leu Thr Gly Ser Leu Thr Leu
 30 35 40
 cgg gcg ctt gca gac aac ccc ggc act gcg ccg ctc gat acg ttc atg 434
 Arg Ala Leu Ala Asp Asn Pro Gly Thr Ala Pro Leu Asp Thr Phe Met
 45 50 55
 acg ctt tcc gaa tcg ctg acc ggc aag aaa ggg ctc agc cgc gtg atc 482
 Thr Leu Ser Glu Ser Leu Thr Gly Lys Lys Gly Leu Ser Arg Val Ile
 60 65 70 75
 ggc gag cgc ctg ctg cag gcg ctg cag aag ggc tcg ttc aag acg gcc 530
 Gly Glu Arg Leu Leu Gln Ala Leu Gln Lys Gly Ser Phe Lys Thr Ala
 80 85 90
 gac agc ctg ccg cag ctc gcc ggc gcg ctc gcg tcc ggt tcg ctg acg 578
 Asp Ser Leu Pro Gln Leu Ala Gly Ala Leu Ala Ser Gly Ser Leu Thr
 95 100 105
 cct gaa cag gaa tcg ctc gca ctg acg atc ctc gag gcc tgg tat ctc 626
 Pro Glu Gln Glu Ser Leu Ala Leu Thr Ile Leu Glu Ala Trp Tyr Leu
 110 115 120
 ggc atc gtc gac aac gtc gtg att acg tac gag gaa gca tta atg ttc 674
 Gly Ile Val Asp Asn Val Val Ile Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Met Phe
 125 130 135
 ggc gtc gtg tcc gat acg ctc gtg atc cgt tcg tat tgc ccc aac aaa 722
 Gly Val Val Ser Asp Thr Leu Val Ile Arg Ser Tyr Cys Pro Asn Lys
 140 145 150 155
 ccc ggc ttc tgg gcc gac aaa ccg atc gag agg caa gcc tg atg gcc 769
 Pro Gly Phe Trp Ala Asp Lys Pro Ile Glu Arg Gln Ala Met Ala
 160 165 170
 gat acc gat acg caa aag gcc gac gtc gtc gtc gtt gga tcg ggt gtc 817
 Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser Gly Val
 175 180 185
 gcg ggc gcg atc gtc gcg cat cag ctc gcg atg gcg ggc aag gcg gtg 865
 Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys Ala Val
 190 195 200
 atc ctg ctc gaa gcg ggc ccg cgc atg ccg cgc tgg gaa atc gtc gag 913
 Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile Val Glu

205	210	215	
cgc itc cgc aat cag ccc gac aag atg gac ttc atg gcg ccg tac ccg			961
Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro Tyr Pro			
220	225	230	
tcg agc ccc tgg gcg ccg cat ccc gag tac ggc ccg ccg aac gac tac			1009
Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn Asp Tyr			
235	240	245	250
ctg atc ctg aag ggc gag cac aag ttc aac tcg cag tac atc cgc gcg			1057
Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile Arg Ala			
255	260	265	
gtg ggc ggc acg acg tgg cac tgg gcc gcg tcg gcg tgg cgc ttc att			1105
Val Gly Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg Phe Ile			
270	275	280	
ccg aac gac ttc aag atg aag agc gtg tac ggc gtc ggc cgc gac tgg			1153
Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg Asp Trp			
285	290	295	
ccg atc cag tac gac gat ctc gag ccg tac tat cag cgc gcg gag gaa			1201
Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala Glu Glu			
300	305	310	
gag ctc ggc gtg tgg ggc ccg gcc ccc gag gaa gat ctg tac tcg ccg			1249
Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr Ser Pro			
315	320	325	330
cgc aag cag ccg tat ccg atg ccg ccg ctg ccg ttg tcg ttc aac gag			1297
Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe Asn Glu			
335	340	345	
cag acc atc aag acg gcg ctg aac aac tac gat ccg aag ttc cat gtc			1345
Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe His Val			
350	355	360	
gtg acc gag ccg gtc gcg cgc aac agc cgc ccg tac gac ggc cgc ccg			1393
Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly Arg Pro			
365	370	375	
act tgt tgc ggc aac aac aac tgc atg ccg atc tgc ccg atc ggc gcg			1441
Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile Gly Ala			
380	385	390	
atg tac aac ggc atc gtg cac gtc gag aag gcc gaa cgc gcc ggc gcg			1489
Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala Gly Ala			
395	400	405	410
aag ctg atc gag aac gcg gtc gtc tac aag ctc gag acg ggc ccg gac			1537
Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly Pro Asp			
415	420	425	
aag cgc atc gtc gcg gcg ctc tac aag gac aag acg ggc gcc gag cat			1585
Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala Glu His			
430	435	440	

cgc gtc gaa ggc aag tat ttc gtg ctc gcc gcg aac ggc atc gag acg 1633
 Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile Glu Thr
 445 450 455
 ccg aag atc ctg ctg atg tcc gcg aac cgc gat ttc ccg aac ggt gtc 1681
 Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn Gly Val
 460 465 470
 gcg aac agc tcg gac atg gtc ggc cgc aac ctg atg gac cat ccg ggc 1729
 Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His Pro Gly
 475 480 485 490
 acc ggc gtg tcg ttc tat gcg agc gag aag ctg tgg ccg ggc cgc ggc 1777
 Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly Arg Gly
 495 500 505
 ccg cag gag atg acg tcg ctg atc ggt ttc cgc gac ggt ccg ttc cgc 1825
 Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro Phe Arg
 510 515 520
 gcg acc gaa gcg gcg aag aag atc cac ctg tcg aac ctg tcg cgc atc 1873
 Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser Arg Ile
 525 530 535
 gac cag gag acg cag aag atc ttc aag gcc ggc aag ctg atg aag ccc 1921
 Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met Lys Pro
 540 545 550
 gac gag ctc gac gcg cag atc cgc gac cgt tcc gca cgc tac gtg cag 1969
 Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr Val Gln
 555 560 565 570
 ttc gac tgc ttc cac gaa atc ctg ccg caa ccc gag aac cgc atc gtg 2017
 Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg Ile Val
 575 580 585
 ccg agc aag acg gcg acc gat gcg atc ggc att ccg cgc ccc gag atc 2065
 Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro Glu Ile
 590 595 600
 acg tat gcg atc gac gac tac gtg aag cgc ggc gcc gcg cat acg cgc 2113
 Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His Thr Arg
 605 610 615
 gag gtc tac gcg acc gcc gcg aag gtg ctc ggc ggc acg gac gtc gtg 2161
 Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp Val Val
 620 625 630
 ttc aac gac gaa ttc gcg ccg aac aat cac atc acg ggc tcg acg atc 2209
 Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser Thr Ile
 635 640 645 650
 atg ggc gcc gat gcg cgc gac tcc gtc gtc gac aag gac tgc cgc acg 2257
 Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys Arg Thr
 655 660 665
 ttc gac cat ccg aac ctg ttc att tcg agc agc gcg acg atg ccg acc 2305

[illegible]

$\langle 210 \rangle$ 2
 $\langle 211 \rangle$ 168
 $\langle 212 \rangle$ PRT
 $\langle 213 \rangle$ Burkholderia cepacia

 $\langle 400 \rangle$ 2[illegible]

<210> 3
 <211> 539
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

<400> 3
 Met Ala Asp Thr Asp Thr Gln Lys Ala Asp Val Val Val Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Ala Gly Ala Ile Val Ala His Gln Leu Ala Met Ala Gly Lys
 20 25 30
 Ala Val Ile Leu Leu Glu Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Trp Glu Ile
 35 40 45
 Val Glu Arg Phe Arg Asn Gln Pro Asp Lys Met Asp Phe Met Ala Pro
 50 55 60
 Tyr Pro Ser Ser Pro Trp Ala Pro His Pro Glu Tyr Gly Pro Pro Asn
 65 70 75 80
 Asp Tyr Leu Ile Leu Lys Gly Glu His Lys Phe Asn Ser Gln Tyr Ile
 85 90 95
 Arg Ala Val Gly Thr Thr Trp His Trp Ala Ala Ser Ala Trp Arg
 100 105 110
 Phe Ile Pro Asn Asp Phe Lys Met Lys Ser Val Tyr Gly Val Gly Arg
 115 120 125
 Asp Trp Pro Ile Gln Tyr Asp Asp Leu Glu Pro Tyr Tyr Gln Arg Ala
 130 135 140
 Glu Glu Glu Leu Gly Val Trp Gly Pro Gly Pro Glu Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 Ser Pro Arg Lys Gln Pro Tyr Pro Met Pro Pro Leu Pro Leu Ser Phe
 165 170 175
 Asn Glu Gln Thr Ile Lys Thr Ala Leu Asn Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 180 185 190
 His Val Val Thr Glu Pro Val Ala Arg Asn Ser Arg Pro Tyr Asp Gly
 195 200 205
 Arg Pro Thr Cys Cys Gly Asn Asn Asn Cys Met Pro Ile Cys Pro Ile
 210 215 220
 Gly Ala Met Tyr Asn Gly Ile Val His Val Glu Lys Ala Glu Arg Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Lys Leu Ile Glu Asn Ala Val Val Tyr Lys Leu Glu Thr Gly
 245 250 255
 Pro Asp Lys Arg Ile Val Ala Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Thr Gly Ala
 260 265 270
 Glu His Arg Val Glu Gly Lys Tyr Phe Val Leu Ala Ala Asn Gly Ile
 275 280 285
 Glu Thr Pro Lys Ile Leu Leu Met Ser Ala Asn Arg Asp Phe Pro Asn

7/9

290 295 300
 Gly Val Ala Asn Ser Ser Asp Met Val Gly Arg Asn Leu Met Asp His
 305 310 315 320
 Pro Gly Thr Gly Val Ser Phe Tyr Ala Ser Glu Lys Leu Trp Pro Gly
 325 330 335
 Arg Gly Pro Gln Glu Met Thr Ser Leu Ile Gly Phe Arg Asp Gly Pro
 340 345 350
 Phe Arg Ala Thr Glu Ala Ala Lys Lys Ile His Leu Ser Asn Leu Ser
 355 360 365
 Arg Ile Asp Gln Glu Thr Gln Lys Ile Phe Lys Ala Gly Lys Leu Met
 370 375 380
 Lys Pro Asp Glu Leu Asp Ala Gln Ile Arg Asp Arg Ser Ala Arg Tyr
 385 390 395 400
 Val Gln Phe Asp Cys Phe His Glu Ile Leu Pro Gln Pro Glu Asn Arg
 405 410 415
 Ile Val Pro Ser Lys Thr Ala Thr Asp Ala Ile Gly Ile Pro Arg Pro
 420 425 430
 Glu Ile Thr Tyr Ala Ile Asp Asp Tyr Val Lys Arg Gly Ala Ala His
 435 440 445
 Thr Arg Glu Val Tyr Ala Thr Ala Ala Lys Val Leu Gly Gly Thr Asp
 450 455 460
 Val Val Phe Asn Asp Glu Phe Ala Pro Asn Asn His Ile Thr Gly Ser
 465 470 475 480
 Thr Ile Met Gly Ala Asp Ala Arg Asp Ser Val Val Asp Lys Asp Cys
 485 490 495
 Arg Thr Phe Asp His Pro Asn Leu Phe Ile Ser Ser Ser Ala Thr Met
 500 505 510
 Pro Thr Val Gly Thr Val Asn Val Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Ala
 515 520 525
 Leu Arg Met Ser Asp Thr Leu Lys Lys Glu Val
 530 535

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 4

Val Arg Lys Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Ala Gly Cys Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Phe Ala Arg Ala Ala Asp Ala Ala Asp
 20 25

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 5
Ala Asp Ala Ala Asp Pro Ala Leu Val Lys Arg Gly Glu Tyr Leu Ala
1 5 10 15

<210> 6
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6
gcggatgcgg cggat

15

<210> 7
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7
cgccagatat tcgcc

15

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
ccggcgctgg tgaaacgc

18

<210> 9

<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9
cccaagcttg ggccgatacc gatacgca 28

<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10
gagaagcttt ccgcacggtc agacttcc 29

<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11
catgccatgg cacacaacga caacact 27

<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12
cccaagcttg ggtcagactt ccttcttcag c 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09556

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/21, C12N1/20, C12Q1/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/21, C12N1/20, C12Q1/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOS (DIALOG),
MEDLINE (STN), DDBJ/ Genbank/ EMBL/PIR/Swiss Prot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A.SAGE et al., Hoxose Phosphate Metabolism and Exopolysaccharide Fromation in <i>Pseudomonas cepacia</i> , Curr. Microbiol. 1990, Vol. 20, No. 3, pages 191-198, table 1	1-14, 19-23, 30-33 15-18, 24-29
A		
X	I.ESTANOL et al., Inorganic phosphate effect on alternate peripheral pathways of glucose catabolism in <i>Pseudomonas cepacia</i> , FEMS Microbil. Lett. 1989, Vol. 60, No. 3, pages 295- 298, table 1	1-14, 19-23, 30-33 15-18, 24-29
A		

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 January, 2002 (22.01.02)

Date of mailing of the international search report
29 January, 2002 (29.01.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/21, C12N1/20, C12Q1/32		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N15/53, C12N9/04, C12N1/21, C12N1/20, C12Q1/32		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), DDBJ/Genbank/EMBL/PIR/SwissProt/Geneseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	A. SAGE <i>et al.</i> , Hexose Phosphate Metabolism and Exopolysaccharide Fromation in <i>Pseudomonas cepacia</i> , Curr. Microbiol. 1990, Vol. 20, No. 3, p. 191-198 Table 1参照	1-14, 19-23, 30-33 15-18, 24-29
X A	I. ESTANOL <i>et al.</i> , Inorganic phosphate effect on alternate peripheral pathways of glucose catabolism in <i>Pseudomonas cepacia</i> , FEMS Microbiol. Lett. 1989, Vol. 60, No. 3, p. 295-298 Table 1参照	1-14, 19-23, 30-33 15-18, 24-29
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22.01.02	国際調査報告の発送日 29.01.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J.P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇	4B 9453
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)